

Japanese Kokai Patent Application No. Sho 63[1988]-43959

**Translated from Japanese by the Ralph McElroy Company, Custom Division
P.O. Box 4828, Austin, TX 78765 USA**

Code: 393-38820

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT JOURNAL
KOKAI PATENT APPLICATION NO. SHO 63[1988]-43959

Int. Cl.⁴: C 09 B 61/00
A 23 L 1/275
C 08 B 37/16

Sequence Nos. for Office Use: C-7537-4H
7110-4B
6779-4C

Application No.: Sho 61[1986]-189297

Application Date: August 11, 1986

Publication Date: February 25, 1988

No. of Inventions: 2 (Total of 3 pages)

Examination Request: Not requested

METHOD FOR STABILIZING ANTHOCYANIN DYE

Inventors: Kuniyoshi Onishi
7-9 Uguisunomori-cho,
Kawanishi-shi, Hyogo-ken

Kinnosuke Kotake
1-18-6 Hashrui, Toyonaka-
shi, Osaka-fu

Applicant: Sanei Chemical
Industry Co., Ltd.

1-1-11 Miwa-cho,
Toyonaka-shi, Osaka-fu

[There are no amendments to this patent.]

Claims

1. An anthocyanin dye constituted by bonding cyclodextrin and other sugars to hydroxyl groups in the glycoside moiety of an anthocyanin group dye.
2. A method for stabilizing an anthocyanin dye, characterized by the fact that cyclodextrin and other sugars are bonded to hydroxyl groups having the glycoside moiety of an anthocyanin dye using the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase as a catalyst.

Detailed explanation of the invention

Industrial application field

This invention pertains to a dye. In particular, it pertains to an anthocyanin dye that can be used as foods, medical supplies, cosmetics, and general industry products.

Here, the anthocyanin group dye means a dye in which a glycoside moiety is bonded in the molecule of said anthocyanin dye. As such a dye, red violet dye ascribed to red cabbage, red violet dye ascribed to grape skin, violet corn, berries [transliteration], and others are mentioned.

Prior art

The anthocyanin dye is poor in light resistance and heat resistance. Furthermore, it is a water-soluble substance, and in its aqueous solution, the greater the pH, namely, the larger the numerical number, the larger the degree of discoloration and fading due to the loss of stabilization. These are general disadvantages of the anthocyanin group dye.

Here, a method that does not discolor and fade the anthocyanin dye, namely, a method that provides a strong property against light and heat, regardless of the pH, is a task for those concerned.

This invention is one of the solutions for solving such a task.

Next, this invention is explained in detail.

Constitution of the invention

An assistant for stabilizing the anthocyanin dye is a sugar and a specific enzyme.

As an adoptable sugar, starch (any origin), glycogen, dextrin (may be straight-chained or ring-shaped), disaccharides, monosaccharides, etc., may be used. They are used alone or by mixing two or more. The amount of sugar used is approximately an equimolar amount of sugar to the anthocyanin group dye.

Next, the process for stabilization is explained. The above-mentioned amount of the anthocyanin group dye and sugar is mixed to form an aqueous solution. The amount of water to be

used is about 5 times or more the total weight of the sugar and anthocyanin group dye.

The enzyme cyclodextrin glycosyltransferase secreted from a bacterium of the *Bacillus* genus, such as *Bacillus macerans* (*B. macerans*), *Bacillus mergaterium* (*B. mergaterium*), *Bacillus circulans* (*B. circulans*), and *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*) is added to it. This enzyme catalyzes three reactions: one that produces cyclodextrin from starch, a reaction that produces a straight-chained oligosaccharide from cyclodextrin and a receptor, and a heterogenous reaction between straight-chained oligosaccharides, while a starch digestive enzyme such as α -amylase mainly catalyzes the hydrolysis of the sugar. The amount added may be about 1×10^6 units (Tilden-Hudson method) to 1 mol of the anthocyanin group dye. Furthermore, the temperature of this dye may be approximately the deactivation temperature of the enzyme, namely, about 60°C for 24 h or less.

Thus, the glucose part included in the sugar is bonded with a specific hydroxyl group having the glycoside moiety of the anthocyanin dye. The term "specific" means the 4-position hydroxyl group of glucose. The completion of the reaction may be confirmed by liquid chromatography (see Figure 1).

Thus, bonding of the sugar with anthocyanin stops the reaction at the moment that the reaction is almost finished and removes the reaction contaminants. In other words, the nonbonded sugar is removed. The group may be freed of impurities using an absorbing resin, ultrafiltration, and other methods. Only the supernatant liquid that is freed of such impurities is taken out,

and the desired stabilized anthocyanin group dye can be obtained by enriching or drying and solidifying.

This invention thus achieves its purpose.

Operation and effect

(1) The desired product obtained is excellent in regard to light resistance, heat resistance, acid resistance, and alkali resistance. Details are explained in the following application examples.

(2) It is not necessary to deactivate the above-mentioned enzyme included in the group in which the bonding of dextrin to an anthocyanin dye, a starting material, is finished. The reason is that the enzyme which completes the bonding does not have actions other than a transitory one.

Application Example 1

1 g of red cabbage dye ($E_{1\text{cm}}^{10\text{V\%}} = 200$) and 1 g of α -cyclodextrin were dissolved in 10 mL of buffer solution (0.01M acetic acid · sodium acetate) with pH = 6.0. Subsequently, 2 mL of CGT-ase (470 U/mL) were added to it and held at 35-40°C for 10 h. The dye solution obtained was purified with an absorbing resin (Diaion HP-40 made by Mitsubishi Chemical Industries Ltd.) and enriched up to $E_{1\text{cm}}^{10\text{V\%}} = 60$.

The dye solution (T) treated with the enzyme and the conventional red cabbage dye (S) $E_{1\text{cm}}^{10\text{V\%}} = 60$ were placed into a polycontainer [sic], adjusted according to the recipe for a

refreshing beverage (refer to the following), irradiated for 8 h by a Fade-O-meter (FA-2 type, Stanford carbon Fade-O-meter, sugar tester), and heated at 95°C for 60 min. Both (T) and (S) were compared and reviewed.

Recipe:

Refreshing beverage placed in a polycontainer	
Sugar	150 (g)
Isomerized sugar	62.5
Citric acid	2.5

The total amount was brought to 1000 (mL) with pure [purified] water.

As seen from the following results, (T) was improved in regard to both the heat resistance and light resistance and the change in color tone was slight.

* The numerical value of the heat resistance and light resistance indicates a residual dye rate.

	8.0% FM 100	量 率 (W%)	8 FM 100	95°C-60min
酶處理(1)(T)	0.0	0.1	8.8	9.27
未處理(2)(S)	0.0	0.1	7.6	7.26

* 7.2 - 7.6 - 8 - 0 韶子 (6)

Key:

1. Enzyme-treated solution (T)
2. Red cabbage dye (S)
3. Amount added (W%) [sic]
4. Irradiation for 8 h by FM
5. Heating at 95°C for 60 min
6. * Abbreviation of Fade-O-meter

Application Example 2

A violet corn dye ($E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%} = 100$) was treated with an enzyme similarly to Application Example 1 and colored on a chewing gum base.

After it was irradiated for 3 days in sunlight in the summer, the light resistance was improved and the change in color tone was slight.

Recipe: Gum base

Vinyl [illegible] resin	200 (g)
BPG (plasticizer)	30
Polyisobutylene	30
Microcrystalline wax	20
Calcium carbonate	20
Powdered sugar	450
Grape sugar	240
Citric acid	1
	1,000

* Light resistance

The numerical value indicates the residual dye rate.

	$E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%}$	$E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%}$ (W%)	Irradiation by sunlight for 3 days
Enzyme-treated solution (1)	60	0.1	72.6
Violet corn dye (2)	60	0.1	50.4

Key: 1. Enzyme-treated solution
 2. Violet corn dye
 3. Amount added (W%)
 4. Irradiation by sunlight for 3 days

Application Example 3

A grape juice dye ($E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%} = 40$) was treated with an enzyme similarly to Application Example 1, covered on a piece of candy, and held for 1 week under a fluorescent lamp. Both the light resistance and the change in color tone were better than those of a conventional grape juice dye.

Recipe: Cabbage

Sugar	650 (g)
Thick malt syrup	500
water	150
	1,300

* Light resistance

The numerical value indicates a residual dye rate.

	$E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%}$	添加量 (W%) (3)	1周間蛍光灯照射 (4)
酵素処理液①	40	0.5	83.9
ブドウ果汁液②	40	0.5	66.4

Key: 1. Enzyme-treated solution
 2. Grape juice dye
 3. Amount added (W%)
 4. Irradiation by a fluorescent lamp for 1 week

Brief explanation of the figures

Figures 1 and 2 are line diagrams [spectra].

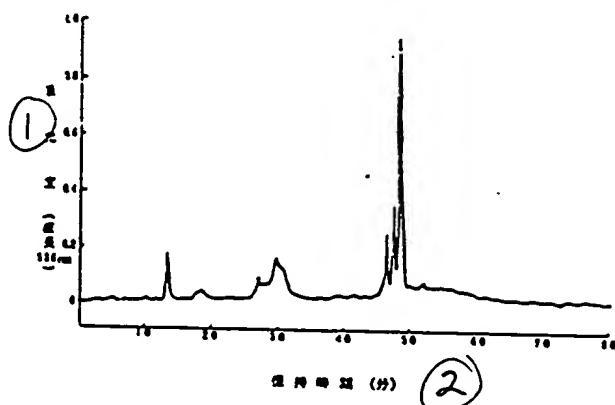


Figure 1:

(A) Red cabbage dye

Key: 1. Absorbance (a wavelength of 536 nm)
2. Duration (min)

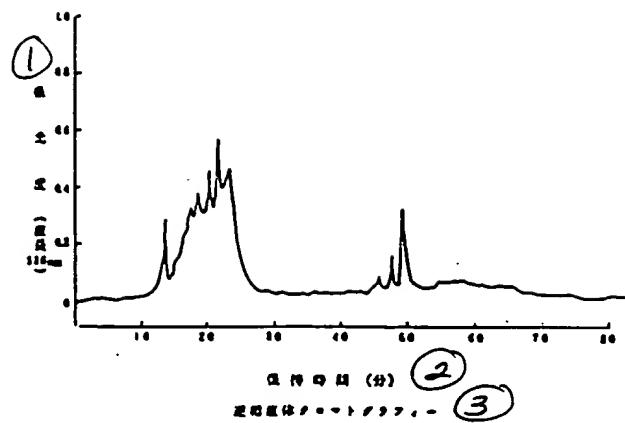


Figure 2:

(B) Red cabbage dye CGT-ase treated solution

Key: 1. Absorbance (at a wavelength of 536 nm)
2. Duration (min)
3. Reverse-phase liquid column chromatography

⑪ 公開特許公報 (A) 昭63-43959

⑫ Int.Cl.

C 09 B 61/00
A 23 L 1/275
C 08 B 37/16

識別記号

庁内整理番号

C-7537-4H
7110-4B
6779-4C

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月25日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全3頁)

⑭ 発明の名称 アントシアニン系色素の安定化法

⑮ 特願 昭61-189297

⑯ 出願 昭61(1986)8月11日

⑰ 発明者 大西 邦義 兵庫県川西市鶴の森町7-9

⑱ 発明者 小竹 欣之輔 大阪府豊中市走井1-18-6

⑲ 出願人 三栄化学工業株式会社 大阪府豊中市三和町1丁目1番11号

明細書

1. 発明の名称

アントシアニン系色素の安定化法

2. 特許請求の範囲

(1) アントシアニン系色素の配糖体部分の水酸基にサイクロデキストリンその他の糖質を結合保持させてなる色素アントシアニン類。

(2) アントシアニン系色素の配糖体部分の有する水酸基に選択サイクロデキストリングリコシルトランスクエラーゼを触媒としてサイクロデキストリンその他の糖質を結合させることを特徴とする色素アントシアニン類の安定化法。

3. 発明の詳細な説明

(所属の産業分野)

この発明は、色素に係るものである。特に食品、医薬品、化粧品、一般工業用として使用することのできるアントシアニン系色素に係るものである。

ここに、アントシアニン系色素とは、アントシアニン色素中、その分子中に配糖体部分を結合保持するものをいう。このような色素としては、赤

キャベツを起源とする赤紫色色素、ブドウ果皮を起源とする赤紫色色素、ホトトギスモロニシ、ベリー、その他を起源とするもの等があげられる。

(従来の技術)

アントシアニン系色素は、耐光性、耐熱性に劣る。更に、このものは、水溶性物質であって、その水溶液系についてそのpHが上昇する程、すなわち数字が大きくなる程、安定を失って変退色する度合が大きくなる。これらが、アントシアニン系色素の一般的欠点である。

ここにおいて、アントシアニン系色素を変退色させない方法、つまり、そのpHの大小如何に係ることなく、しかも光に強く更に熱に強い性質をこのものに付与することが当業者の課題となる。

この発明は、この課題を解決するための1つの回答である。

以下に、この発明を詳しく説明する。

(発明の構成)

アントシアニン系色素を安定化するための助剤は、糖質と特定の酵素である。

採用することのできる糖質としては、デン粉（その起源の如何は問わない）、グリコーゲン、デキストリン（直鎖状、環状のいずれでもよい）、2倍、单糖のいずれでもよい。これらは、單離で又は2種以上併用される。その使用量は、アントシアニン系色素にたいして約等モル以上の量である。

次に、安定化の工程を説明する。アントシアニン系色素と糖質とを前記使用量において配合し、これを水系とする。使用する水量は、糖質とアントシアニン系色素の合計重量の約5倍量以上でよい。

このものに、バチルスマセラヌス (*B.macerans*)、バチルスマガテリウム (*B.megaterium*)、バチルスナーキュラヌス (*B.circularans*)、バチルスステアロテルモフィリス (*B.stearothermophilus*) 等のバチルス (*Bacillus*) 属の細胞が分認する酵素サイクロデキストリングリニシルトランスクレターゼ (Cyclo-dextrin glycosyltransferase) を添加する。この酵素は、D-アミラーゼ等のデン粉消化酵素が主に、

目的の安定化したアントシアニン系色素を得ることができる。

ここに、この発明はその目的を達し終える。

(作用及び効果)

①目的取得物は、耐光、耐熱、耐酸、耐アルカリ性に優れて連れている。詳しくは、次に記す実施例にゆづる。

②出発物質アントシアニン系色素へのデキストリンの結合を終えた系からそれに含有する前記酵素を失活させることは必要ではない。その故は、結合の役目を終えた当該酵素は、転移作用以外の作用を有しないからである。

実施例 1

赤キャベツ色素 ($E_{1cm}^{10V\%} = 200$) 1g、D-アミラーゼ (キラル・酵母ナトリウム) 1.0 gに溶解し、その後 CGT-ase (470U/g) 2gを加え、35~40°C・10時間放置した。得られた色素液を吸着樹脂 (ダイヤイオンHP-40三交換成) で精製、 $E_{1cm}^{10V\%} = 60$ まで濃縮した。

糖質の加水分解を検証するのにたいし、デン粉からサイクロデキストリンを生成する反応、サイクロデキストリンと受容体とから直鎖のオリゴ糖を生成する反応、および直鎖オリゴ糖間の不均化反応の3つの作用を検証する。このものの添加量は、アントシアニン系色素 1 mol. にたいし、 1×10^6 ユニット (Tilden-Hudson法) 程度でよい。更に、この系の温度は、この酵素の失活温度約60°C・24時間以下の条件でよい。

このようにすると、糖質の含有するグルニース部分は、アントシアニン系色素の配糖体の有する特定の水酸基に結合する。特定とは、グルニースも位の水酸基をいう。反応の完了は、液体クロマトグラフィーにより確認すればよい (図1参照)。

このようにして、糖質のアントシアニンへの結合が、ほぼ終了した時点で反応を止め、系を精製する、すなわち未結合糖質の除去を行う。それには、この系を吸着型樹脂、あるいは膜外ろ過、その他の方法を用いて精製すればよい。精製を終った清澄液のみを取り、濃縮しあるいは乾燥して、

酵素処理した色素液 (T) と従来の赤キャベツ色素 (S) $E_{1cm}^{10V\%} = 60$ をそれぞれ、ポリ容器入り清涼飲料用の処方 (下記参照) に従い調整し、フェードメーター (FA-2型、スタンダードカーボンフェードメーター、スガ試験機) 8時間照射、および95°C・60分間加熱し、両者 (T) と (S) を比較検討した。

処方 ポリ容器入り清涼飲料

砂糖	15.0 (g)
異性化糖	6.25
クエン酸	2.5

清水で全量を1000 (ml) とした。

(T) は下記結果からわかるように、耐熱、耐光性とも向上しており、色調変化も少なかった。

○耐熱、耐光性数字は色素残存率を示す。

	$E_{1cm}^{10V\%}$	添加量 (W%)	PM8時間照射	95°C・60分間加熱
酵素処理 (T)	60	0.1	88.1	92.7
赤キャベツ色素 (S)	60	0.1	74.8	72.0

* フェードメーターの略字

実施例2

オトクモロコシ色素 ($E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%} = 100$) を、実施例1と同様に酵素処理し、チューリングムベースにて着色し、夏期3日間日光照射したところ、耐光性は向上し、色調変化も少なかった。

処方 ガムベース

消泡ビニール樹脂	200 (g)
B P B G (可塑剤)	30
ポリイソブチレン	30
微結晶ワックス	20
炭酸カルシウム	20
砂糖	450
アドウ糖	240
クエン酸	1
	1,000

○耐光性 数字は色素残存率を示す

	$E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%}$	吸光度	3日間日光照射
酵素処理液	6.0	0.1	72.6
オトクモロコシ色素	6.0	0.1	50.4

図面(1)

実施例3

アドウ果汁色素 ($E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%} = 40$) を実施例1と同様に、酵素処理し、キャンダーにて着色し、蛍光灯下、1週間放置したところ、耐光性、色調変化とも、従来のアドウ果汁色素より良好であった。

処方 キャンダー

砂糖	850 (g)
水	500
水	150
1,300	

○耐光性 数字は色素残存率を示す

	$E_{1\text{cm}}^{10\text{V}\%}$	吸光度 (W%)	1週間蛍光灯照射 時間
酵素処理液	4.0	0.5	83.9
アドウ果汁色素	4.0	0.5	66.4

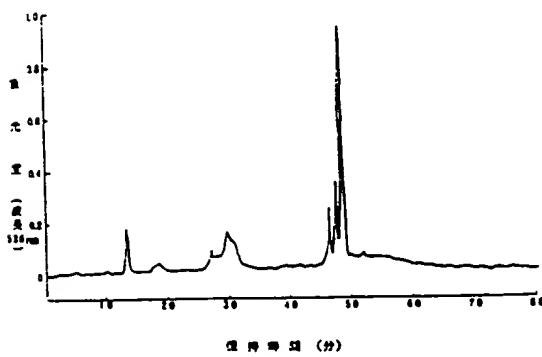
4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図……検図

特許出願人 三栄化学工業株式会社

図面(2)

第1図
(A) 赤キヤベツ色素



第2図
(B) 赤キヤベツ色素 CGT-ase 处理液

